

保肝颗粒对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用

刘丽, 李军, 訾慧, 卢健, 张英莉, 范颖*

(辽宁中医药大学基础医学院, 省部共建中医脏象理论
及应用教育部重点实验室, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**考察保肝颗粒对四氯化碳(CCl_4)致小鼠急性化学性肝损伤的保护作用。**方法:**90只昆明小鼠按体重随机分为正常组、模型组、护肝片组($0.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、保肝颗粒高、中、低剂量组($12.9, 6.45, 3.225\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每组15只。每日*ig*给药1次, 连续30 d。末次给药1 h后, 除正常组外, 其余各组分别*ip* $0.1\% \text{ CCl}_4$ $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1次, 建立小鼠急性化学性肝损伤模型, 24 h后处死小鼠, 收集肝组织及血清标本, 检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)活性; 测定肝组织总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量及进行肝组织病理学检查。**结果:**与正常组比较, 模型组小鼠血清ALT, AST, LDH水平明显升高, 肝组织T-SOD活性及GSH含量明显降低, MDA含量明显升高, 均具有明显的统计学差异($P < 0.05$), 模型组肝组织病理学发现中央静脉和肝细胞结构变形明显, 肝细胞排列紊乱, 肝细胞肿胀、界限不清, 细胞核变大, 有的部位核仁消失, 肝血窦变小、有充血, 并可见大量成团的炎性细胞; 与模型组比较, 保肝颗粒高、中、低剂量组均能明显降低肝损伤小鼠血清ALT, AST, LDH水平($P < 0.05$), 提高肝组织T-SOD活性及GSH含量($P < 0.05$), 降低MDA含量($P < 0.05$), 并呈现量效关系; 明显改善肝组织的病理学损伤。**结论:**保肝颗粒对 CCl_4 致小鼠急性化学性肝损伤具有抗氧化及保护肝功能作用。

[关键词] 保肝颗粒; 急性化学性肝损伤; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 肝功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0123-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200123

Protective Effect of Baogan Granules on Acute Chemical Liver Injury in Mice LIU Li, LI Jun, ZI Hui, LU Jian, ZHANG Ying-li, FAN Ying* (School of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Ministry of Education of China and Province-Ministry Co-construct, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protect effects of Baogan granules on acute chemical liver injury of mice induced by carbon tetrachloride (CCl_4). **Method:** Ninety Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, hugan tablet group ($0.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), baogan granules high, middle, low dose group ($12.9, 6.45, 3.225\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Mices were given medicine once a day continuing 30 days. 1h after the last administration, in addition to the normal 1 group, each group respectively *ip* $0.1\% \text{ CCl}_4$ $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, acute chemical liver injury in mice model was established. 24 h after death mice, collect liver tissue and serum specimens, detection of serum glutamic acid transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) activity; determination of liver tissue total superoxide dismutase (T-SOD) activity, reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) content and hepatic histopathological examination. **Result:** Baogan granules can significantly reduce liver damage ALT, AST and LDH level in mice ($P < 0.05$), Increase the T-SOD activity and GSH content ($P < 0.05$), Reduce the MDA content in liver homogenate ($P < 0.05$), and show concentration-response relationship; Greatly improve the pathology of liver tissue injury. **Conclusion:** Baogan granules on CCl_4 induced acute chemical liver injury in mice has antioxidant and protect liver function function.

[收稿日期] 20141106(009)

[基金项目] 辽宁省科技厅星火计划项目(2012215018)

[第一作者] 刘丽, 硕士, 高级实验师, 从事中药小复方优选关键技术研究工作, Tel:024-31207165, E-mail:lnutcmll@163.com

[通讯作者] *范颖, 博士, 教授, 从事方剂配伍规律研究工作, Tel:024-31207104, E-mail:lnzyfy@126.com

[Key words] Baogan granules; acute chemical liver injury; superoxide dismutase; malondialdehyde; liver function

肝脏是人体主要的代谢和防御器官,经常受到化学毒物、药物、酒精等肝毒性物质的损害,从而引发肝纤维化、肝硬化、肝癌等,严重威胁人体的健康。寻求抗肝损伤、肝纤维化等药物日益受到关注^[1-3]。保肝颗粒由辽宁道地药材五味子以及药食两用的葛根等为主组成,现代研究表明五味子、葛根对肝脏均具有保护作用^[4-6]。本研究旨在考察保肝颗粒对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用,为其进一步开发及临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,SPF 级,雄性,体重 18 ~ 22 g,购自辽宁长生生物技术有限公司,合格证号 SCXK(辽)2010-0001。

1.2 药物及试剂 保肝颗粒由辽宁中医药大学省部共建中医脏象理论及应用教育部重点实验室制备,组方药材均购自辽宁贵今生物医药有限公司,批号 20130901;护肝片(黑龙江葵花药业股份有限公司,批号 201312007),谷氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒均由四川迈克生物科技股份有限公司,批号 1113051;四氯化碳(CCl₄,天津市瑞金物化学有限公司,批号 20131202),总超氧化物歧化酶(T-SOD,批号 20140529),丙二醛(MDA,批号 20140530),还原型谷胱甘肽(GSH,批号 20140526)试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供,BCA 蛋白浓度试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号 45600150)。

1.3 仪器 Accute TBA-40FR 型全自动生化分析仪(日本东芝株式会社),ALC-210.3 型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),RM2235 型石蜡切片机(德国莱卡公司),BX51 型显微镜(日本 Olympus 公司),TGL20M-II 型台式高速大容量冷冻离心机(湖南省凯达实业以展有限公司),iMark 型全自动酶标仪(美国伯乐公司),CK-1000 型冷冻研磨仪(美国 Thmorgan 公司),DK-S22 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 急性化学性肝损伤模型建立 按 10 mL·kg⁻¹ 体重剂量一次性给小鼠 ip 0.1% CCl₄ 花生油溶液制备肝损伤模型^[7]。

2.2 中药制备 取五味子、葛根等药材,粉碎成粗

粉,以乙醇为溶媒回流提取。第 1 次加乙醇 10 倍量,提取 2 h;第 2 次加 8 倍量,提取 1.5 h;第 3 次加 6 倍量,提取 1 h。合并 3 次提取液,回收乙醇后,浓缩成干浸膏。经提取回收溶剂,浓缩,加入糖粉,65 °C 烘干,制备颗粒。

2.3 分组处理 90 只昆明种小鼠按体重随机分为 6 组,分别为正常组、模型组、护肝片组、保肝颗粒高、中、低剂量组,每组 15 只。护肝片组按 0.7 g·kg⁻¹ 剂量 ig,保肝颗粒高、中、低剂量分别按 12.9, 6.45, 3.225 g·kg⁻¹ ig,正常组和模型组 ig 等体积蒸馏水。每天 ig 给药 1 次,连续 30 d,末次给药 1 h 后,除正常组外,其余各组分别一次性 ip 0.1% CCl₄ 10 mL·kg⁻¹,建立小鼠急性化学性肝损伤模型。禁食不禁水 24 h,摘眼球取血,处死小鼠,收集肝组织及血清标本,备用。

2.4 检测指标 采用基于 IFCC2002 配方法检测血清 ALT,AST,LDH 的活性;采用羟胺法测定肝组织 T-SOD 活性,二硫代二硝基苯甲酸法测定肝组织 GSH 含量,硫代巴比妥酸法测定 MDA 肝组织含量,考马斯亮蓝法测定肝组织中蛋白质含量;计算肝脏指数,肝脏指数 = 肝脏质量/禁食体重;HE 染色观察肝组织病理学变化。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行实验数据方差分析,药物组间比较采用单因素方差分析加两两比较(LSD 法),计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠体重的影响 造模治疗前后各组小鼠体重变化无统计学意义,表明保肝颗粒在本试验条件下对动物的体重无明显影响。

3.2 对小鼠肝脏指数的影响 各组肝脏指数的差异无统计学意义,表明化学性肝损伤小鼠肝脏指数无明显变化。保肝颗粒对化学性肝损伤小鼠肝脏指数无明显影响。见表 1。

3.3 对小鼠血清 ALT,AST,LDH 的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清 ALT,AST,LDH 水平均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 ALT,AST,LDH 水平均明显降低($P < 0.01, P < 0.05$);与护肝片组比较,保肝颗粒高、中剂量组 ALT,AST,LDH 水平无明显性差异,保肝颗粒低剂量组 ALT,AST,LDH 水平有明显性差异

表 1 保肝颗粒对小鼠肝脏指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Baogan granules on liver index in mice($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	禁食体重 /g	肝重 /g	肝脏指数 /%
正常	-	13	39.08 ± 3.80	1.72 ± 0.37	4.37 ± 0.59
模型	-	14	38.93 ± 2.56	1.84 ± 0.28	4.73 ± 0.63
护肝片	0.7	15	36.73 ± 2.76	1.60 ± 0.25	4.37 ± 0.75
保肝颗粒	12.9	13	37.31 ± 1.60	1.69 ± 0.21	4.55 ± 0.67
	6.45	13	36.08 ± 2.57	1.69 ± 0.20	4.73 ± 0.76
	3.225	13	37.92 ± 2.02	1.62 ± 0.28	4.26 ± 0.74

($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 对小鼠肝组织 T-SOD, GSH, MDA 的影响 与正常组比较,模型组的 T-SOD 活性及 GSH 含量明显降低,MDA 含量明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 T-SOD 活性明显升高,GSH 含量升高,MDA 含量降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与护肝片组比较,保肝颗粒高、中、

低剂量组 T-SOD, GSH, MDA 水平无明显性差异。见表 3。

3.5 对小鼠肝组织病理学的影响 光学显微镜下观察,正常组可见肝脏组织结构正常,肝细胞排列规整,肝细胞大小均匀,中央静脉大小正常,肝细胞形态结构清晰,核膜完整,核仁清晰可见。模型组中央静脉和肝细胞结构变形明显,肝细胞排列紊乱,肝细胞肿胀、界限不清,细胞核变大,有的部位核仁消失,肝血窦变小、有充血,并可见大量成团的炎性细胞,表明造模成功。与模型组相比,护肝片组肝细胞组织形态、结构有所恢复,肝细胞大小与模型组比较有所改善,可见到肝细胞膜,肝细胞水肿现象明显减轻,仍可见小叶间浸润的炎性细胞。保肝颗粒高、中、低剂量组肝细胞组织形态、结构,与模型组比较有所恢复,肝细胞排列层次较规则,肝细胞大小较均匀,肝细胞水肿基本消失,有的部位仍可见炎性细胞浸润。见图 1。

表 2 保肝颗粒对小鼠血清 ALT,AST,LDH 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Baogan granules on ALT,AST,LDH in mice serum ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹
正常	-	13	120.72 ± 34.93 ²⁾	140.14 ± 69.81 ²⁾	1 257.78 ± 307.27 ²⁾
模型	-	14	280.66 ± 59.60	574.22 ± 162.46	2 577.78 ± 506.66
护肝片	0.7	15	185.53 ± 47.13 ²⁾	301.41 ± 182.84 ²⁾	1 915.67 ± 500.55 ²⁾
保肝颗粒	12.9	13	192.37 ± 47.57 ²⁾	323.21 ± 131.39 ²⁾	2 086.33 ± 477.01 ²⁾
	6.45	13	210.29 ± 46.31 ²⁾	330.89 ± 160.29 ²⁾	1 928.83 ± 309.31 ²⁾
	3.225	13	229.88 ± 51.75 ²⁾	464.92 ± 156.06 ¹⁾	2 188.45 ± 314.06 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 保肝颗粒对小鼠肝匀浆 T-SOD,MDA,GSH 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Baogan granules on T-SOD,MDA,GSH in mice liver homogenate ($\bar{x} \pm s$)

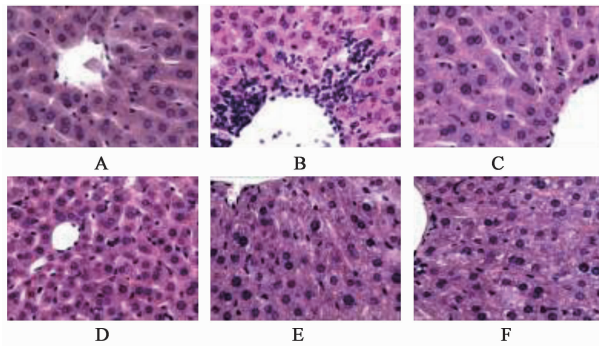
组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	T-SOD/U·mg ⁻¹	GSH/mg·g ⁻¹	MDA/ μ mol·g ⁻¹
正常	-	13	64.99 ± 3.26	4.81 ± 0.92	0.99 ± 0.16
模型	-	14	49.61 ± 3.81	3.46 ± 0.55	1.59 ± 0.18
护肝片	0.7	15	55.58 ± 5.02 ²⁾	4.22 ± 0.62 ²⁾	1.28 ± 0.18 ²⁾
保肝颗粒	12.9	13	56.65 ± 4.73 ²⁾	4.39 ± 0.82 ²⁾	1.22 ± 0.14 ²⁾
	6.45	13	53.53 ± 4.82 ²⁾	4.29 ± 0.47 ²⁾	1.24 ± 0.12 ²⁾
	3.225	13	56.15 ± 6.24 ¹⁾	3.99 ± 0.66 ¹⁾	1.32 ± 0.14 ²⁾

4 讨论

研究证实,CCl₄ 诱导的动物急性肝损伤的机制是 CCl₄ 进入体内引起肝微粒体细胞色素 P450 分解活化,产生过量的自由基,进而引起肝微粒体细胞膜的脂质过氧化,从而破坏肝细胞膜结构和功能的完整性,导致肝细胞的损伤坏死。ALT,AST,LDH 是

反映肝损伤的敏感性标志酶,其含量变化在一定程度上可反映肝细胞的受损程度。肝损伤时,细胞膜通透性增加,使细胞内可溶性酶 ALT,AST,LDH 渗漏进入血液,引起血清中 ALT,AST,LDH 水平的升高^[8-9]。

T-SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重



A. 正常组; B. 模型组; C. 护肝片组; D. 保肝颗粒 12.9 g·kg⁻¹组; E. 保肝颗粒 6.45 g·kg⁻¹组; F. 保肝颗粒 3.225 g·kg⁻¹组

图1 保肝颗粒对小鼠肝组织形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effects of Baogan granules on morphology of liver tissue in mice (HE, ×400)

要的作用,其活性降低会导致体内氧自由基产生增多,从而使细胞膜结构与功能受到损伤,T-SOD含量变化可间接反映自由基反应时组织的破坏程度^[10]。MDA是脂质过氧化的产物,可与生物大分子结合形成加醛复合物,破坏细胞膜的结构和功能,导致细胞肿胀、坏死,其含量的高低可反映机体细胞受自由基攻击和损伤的程度^[11]。GSH具有保护细胞膜及蛋白质免受自由基的损伤的作用,GSH水平降低,表明机体抗氧化能力亦下降^[12]。肝脏T-SOD活性和MDA,GSH含量的变化,在一定程度上反映肝组织脂质过氧化和受自由基损伤的程度。

本研究结果显示,血清ALT,AST,LDH含量明显升高,反映CCl₄诱导急性化学性肝损伤小鼠的肝功能受损;而T-SOD活性降低,GSH含量减少,MDA含量增高则反映脂质过氧化程度增强;病理切片显示肝细胞受损严重,表明脂质过氧化增强导致肝细胞损伤。保肝颗粒明显降低CCl₄诱导急性化学性肝损伤小鼠血清ALT,AST,LDH水平,增强肝组织T-SOD活性,提高GSH含量,降低MDA含量,同时还可明显减轻肝组织炎症病变程度。由此提示,保肝颗粒对CCl₄诱导小鼠急性化学性肝损伤有保护

作用,其机制可能与其抑制脂质过氧化反应有关。

[参考文献]

- [1] 张睿,陈金锋,高家荣,等.疏肝健脾方对化学性肝损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2014,30(2):140-143.
- [2] 吕纪华,邓聿胤,刘瑛,等.乙肝清对小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(6):253-256.
- [3] 曹国琼,张永萍,隋艳华,等.甘宝胶囊对小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(1):264-267.
- [4] 陈宝芝,李生,吴金滢,等.北五味子粗多糖对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J].吉林大学学报,2014,40(1):92-96.
- [5] 宋小莉.葛根对化学性肝损伤小鼠的保护作用[J].山东中医杂志,2010,29(2):121-122.
- [6] 田维毅,王庆学,王文佳,等.葛根散对急性酒精性肝损伤小鼠肝微粒体CYP450含量及CYP2E1活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):183-186.
- [7] 魏伟,吴希美,李元建.药理实验方法学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2010:1129.
- [8] 陈培波,刘伟萍,王彦平,等.山药水提取物对化学性肝损伤的保护作用[J].现代预防医学,2009,36(18):3437-3440.
- [9] 孙海燕,付庆云,王朝辉,等.鬼针草总黄酮对小鼠急性肝损伤的影响[J].河南科技学院学报,2014,42(5):1-6.
- [10] 吴亚辉,陈志鹏,杨玲玲,等.玄参提取物对小鼠急性化学性肝损伤保护作用的研究[J].四川动物,2014,33(3):386-389.
- [11] 闫冰,李黎,陈星,等.二至丸的保肝活性部位群对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(1):216-219.
- [12] 向维,陈松华,李朝品,等.彩虹明樱蛤多糖对小鼠急性化学性肝损伤的保护作用[J].中国生化药物杂志,2013,33(1):43-45.

[责任编辑 周冰冰]